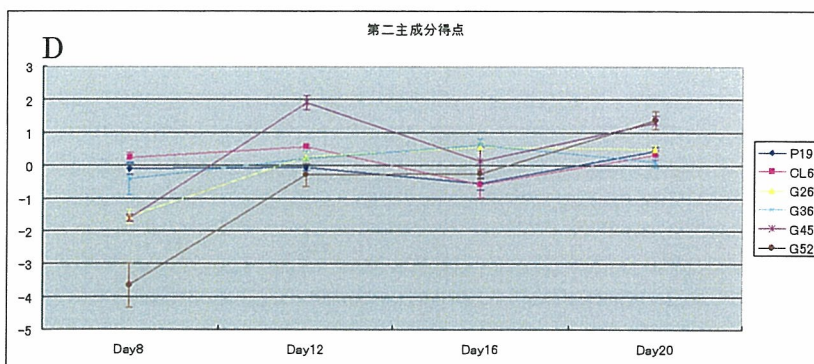
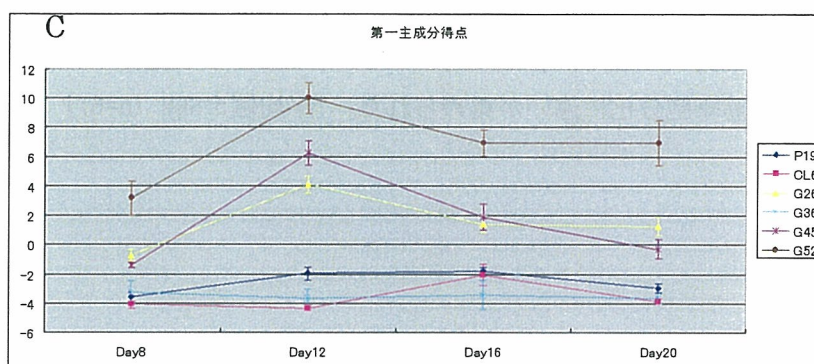
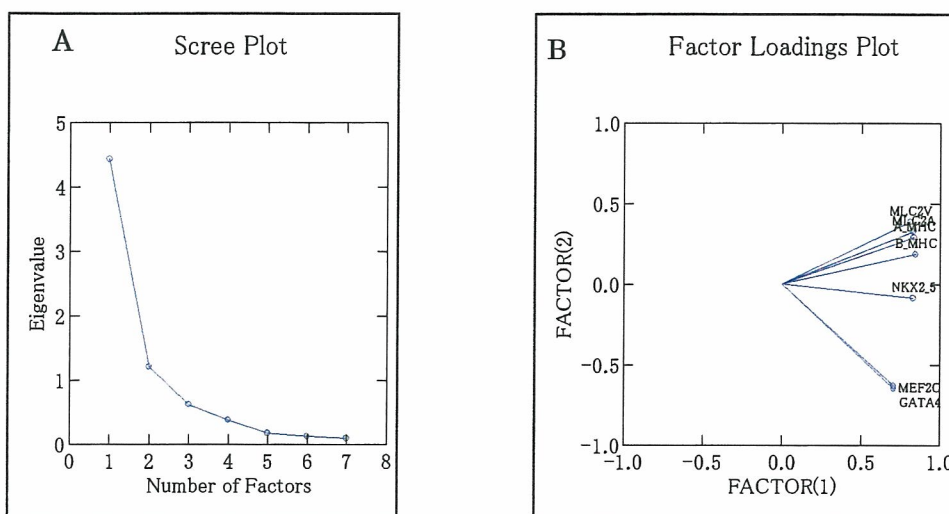


Fig.3 定量性リアルタイム RT-PCR による心筋細胞特異的マーカー遺伝子測定  
 Nkx 2.5、GATA4、MEF2C、 $\alpha$ MHC、 $\beta$ MHC、MLC2a、MLC2v の遺伝子発現の時間変化。細胞株により、心筋細胞分化に違いが認められた。[平均値 $\pm$ SEM (n=6)]



**Fig.4. 主成分分析**

- A: 主成分寄与率。第1主成分寄与率は63.2%、第2主成分寄与率は17.1%。
- B: 変量プロット。横軸は第1主成分であり、全ての値が正となった。縦軸は第2主成分であり比較的初期に発現が見られるマーカーが負に、比較的後期に見られるマーカーが正の値となった。
- C: 第1主成分得点の時間変化。細胞株により心筋細胞への分化能に違いが見られた。[平均値±SEM (n=6)]
- D: 第2主成分得点の時間変化。細胞株により心筋細胞への分化能に違いが見られた。[平均値±SEM (n=6)]

Table 2 心筋細胞分化能と CMP 遺伝子発現量の相関

Gene Name	Localization	1st Principal Component		2nd Principal Component		Time for Beating		Nodule Number	
		rs	p	rs	p	rs	p	rs	p
CMP1	Soluble	0.8237	2.2622E-08	0.7368	3.4382E-06	-0.4932	5.6143E-03	0.4384	1.5375E-02
CMP2	Soluble	0.7836	3.0419E-07	0.7464	2.1840E-06	-0.5419	1.9793E-03	0.4153	2.2483E-02
CMP3	Membrane	0.7596	1.1297E-06	0.4397	1.5050E-02	-0.6333	1.7256E-04	0.6455	1.1738E-04
CMP4	Membrane	0.7596	1.1297E-06	0.6386	1.4632E-04	-0.4859	6.4824E-03	0.4202	2.0797E-02
CMP5	Membrane	0.7573	1.2700E-06	0.4660	9.4414E-03	-0.6856	2.8970E-05	0.6881	2.6429E-05
CMP6	Membrane	-0.7196	7.4228E-06	-0.5235	2.9877E-03	0.6771	3.9680E-05	-0.5907	5.8967E-04
CMP7	Membrane	0.6589	7.5150E-05	0.1282	4.9962E-01	-0.4920	5.7517E-03	0.6004	4.5209E-04
CMP2	Soluble	0.6521	9.4584E-05	0.3798	3.8451E-02	-0.8038	8.8491E-08	0.7672	7.5655E-07
CMP8	Membrane	-0.6246	2.2483E-04	-0.4588	1.0760E-02	0.4177	2.1626E-02	-0.3824	3.7023E-02
CMP9	Soluble	-0.5903	5.9552E-04	-0.3103	9.5158E-02	0.5030	4.6124E-03	-0.5164	3.4870E-03
CMP10	Soluble	0.5658	1.1207E-03	0.2336	2.1401E-01	-0.6151	2.9798E-04	0.6455	1.1711E-04
CMP11	Soluble	0.5651	1.1385E-03	0.4277	1.8393E-02	-0.6308	1.8602E-04	0.5858	6.7133E-04
CMP12	Membrane	0.5560	1.4231E-03	0.4157	2.2328E-02	-0.3982	2.9288E-02	0.4165	2.2051E-02
CMP13	Membrane	0.5399	2.0717E-03	0.3055	1.0065E-01	-0.4299	1.7737E-02	0.4323	1.7034E-02
CMP13	Membrane	0.5388	2.1265E-03	0.1761	3.5190E-01	-0.5858	6.7133E-04	0.6820	3.3193E-05
CMP14	Soluble	0.5366	2.2370E-03	0.2432	1.9527E-01	-0.4671	9.2595E-03	0.5012	4.7823E-03
CMP15	Membrane	0.4850	6.5941E-03	0.0012	9.9499E-01	-0.6735	4.5267E-05	0.7806	3.6107E-07
CMP16	Membrane	0.4685	9.0214E-03	-0.1186	5.3243E-01	-0.4744	8.0812E-03	0.6400	1.3958E-04
CMP17	Soluble	-0.4559	1.1339E-02	-0.0503	7.9171E-01	0.7673	7.5311E-07	-0.8313	1.2818E-08
CMP18	Membrane	0.4530	1.1941E-02	-0.0635	7.3888E-01	-0.3690	4.4782E-02	0.5480	1.7182E-03
CMP19	Soluble	-0.4404	1.4860E-02	-0.1066	5.7494E-01	0.6430	1.2695E-04	-0.7124	1.0035E-05
CMP20	Soluble	-0.4256	1.9052E-02	0.0036	9.8496E-01	0.4214	2.0392E-02	-0.5395	2.0930E-03
CMP21	Membrane	0.3970	2.9860E-02	-0.0204	9.1493E-01	-0.5809	7.6275E-04	0.6832	3.1728E-05
CMP22	Soluble	-0.3924	3.1979E-02	-0.2839	1.2836E-01	0.5249	2.9012E-03	-0.4579	1.0943E-02
CMP23	Soluble	-0.3924	3.1979E-02	0.1090	5.6632E-01	0.6978	1.8145E-05	-0.8220	2.5421E-08
CMP24	Soluble	-0.3856	3.5318E-02	0.1414	4.5602E-01	0.4623	1.0104E-02	-0.6030	4.2011E-04

CMP2 および CMP13 は 2 つの Probe Set で検出された。表中に黄色で示したものは、膜タンパクをコードする遺伝子であり、白で示したものは可溶性タンパクをコードする遺伝子である。rs: 順位相関係数、p: 有意確率

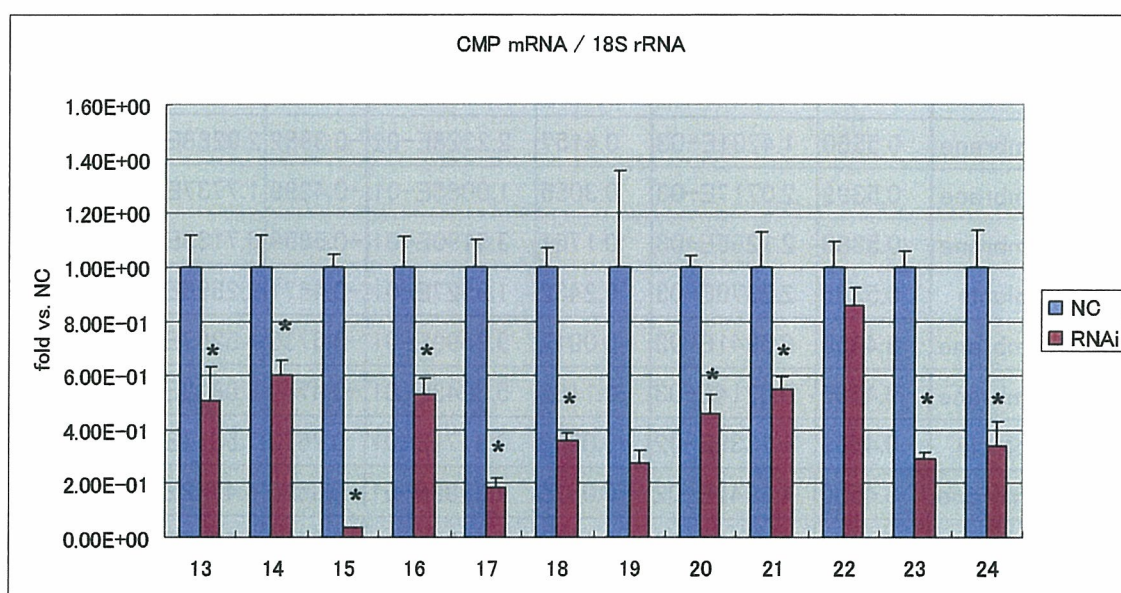
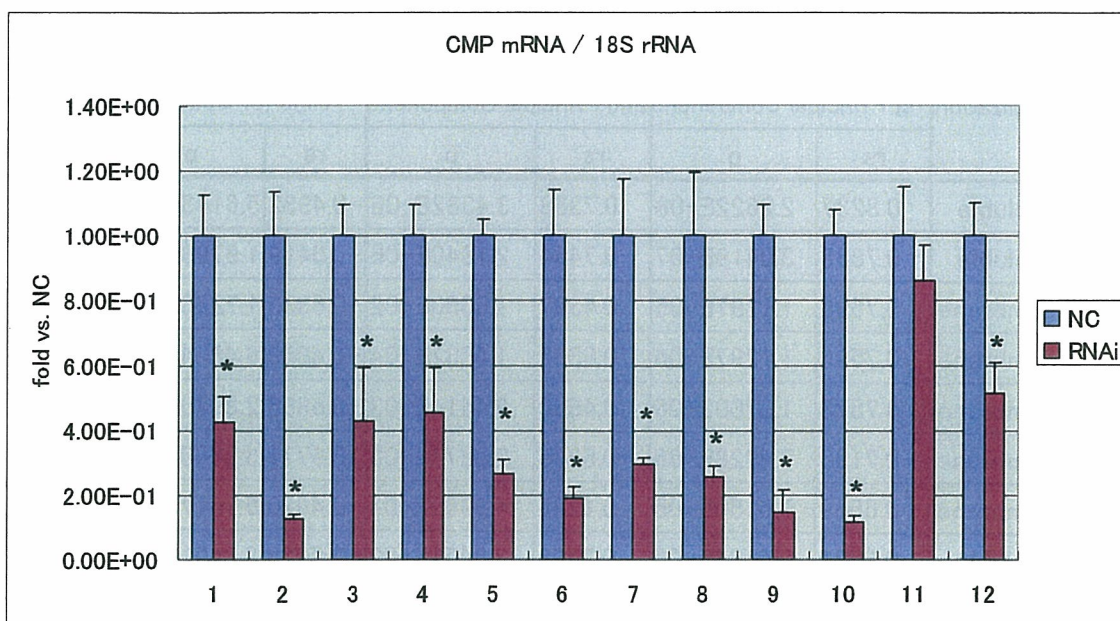
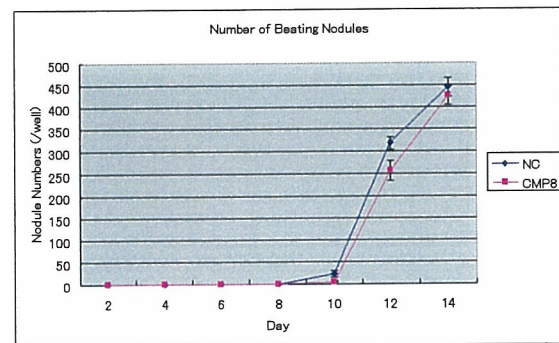
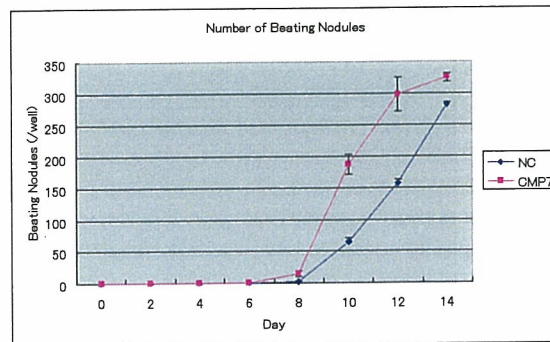
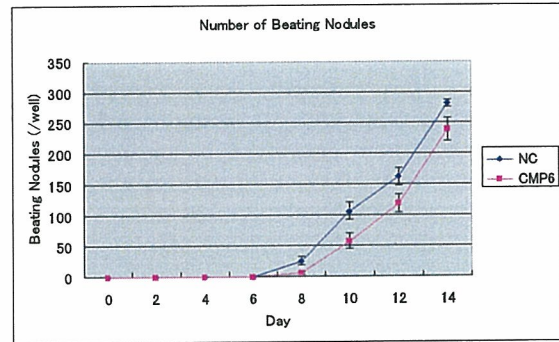
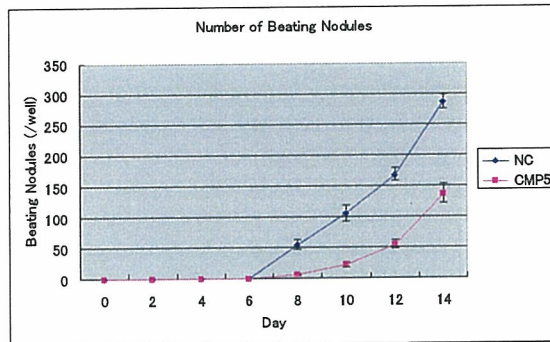
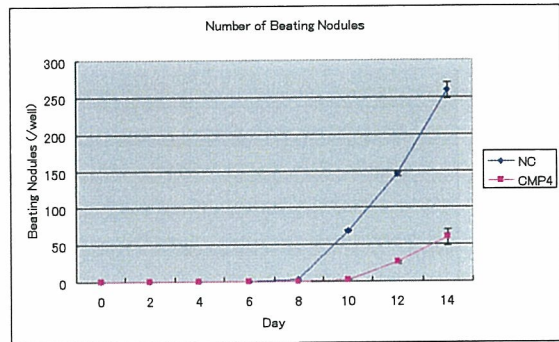
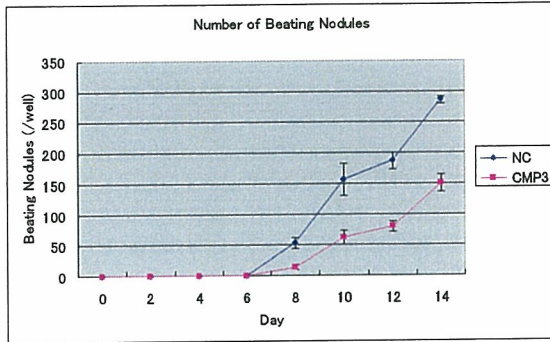
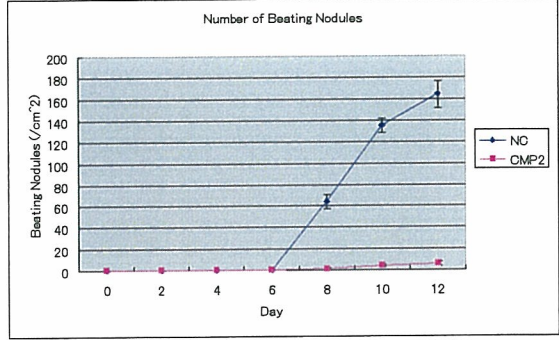
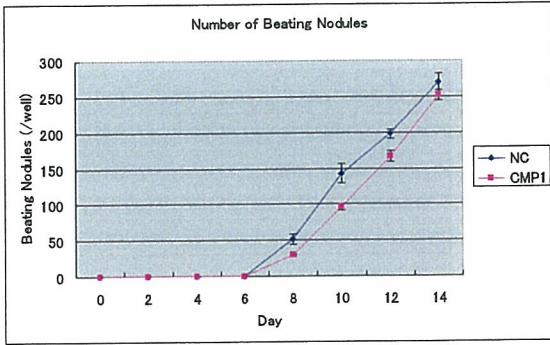
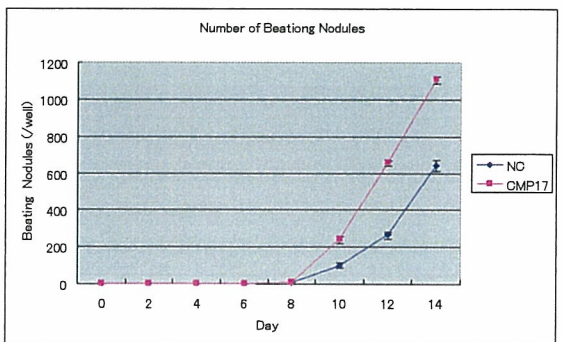
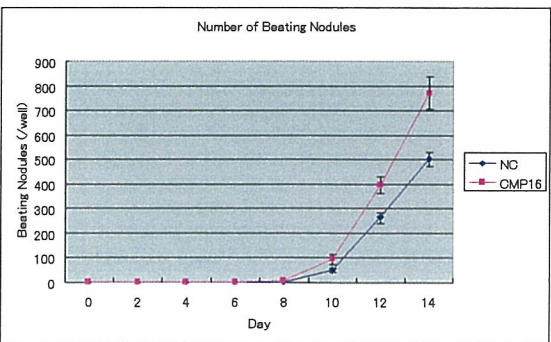
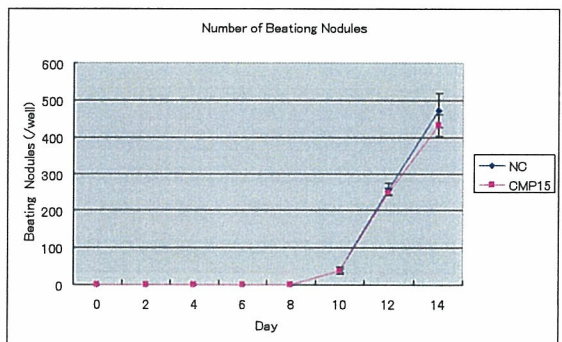
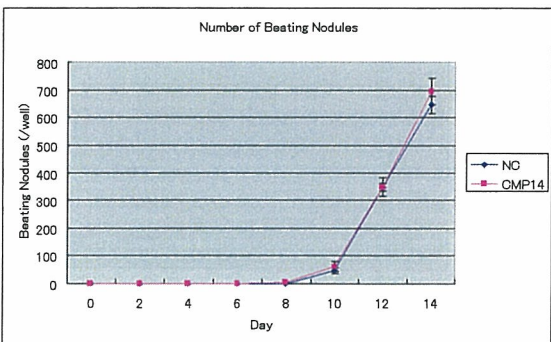
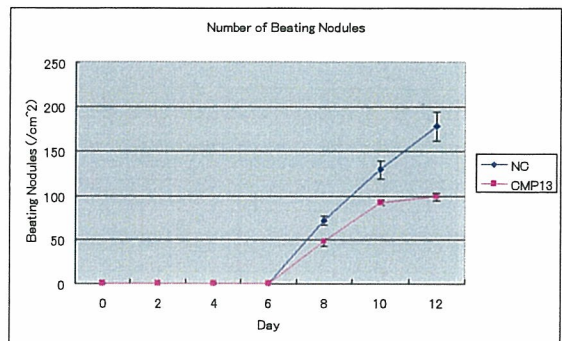
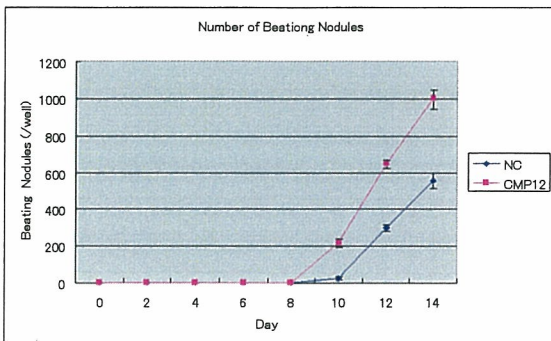
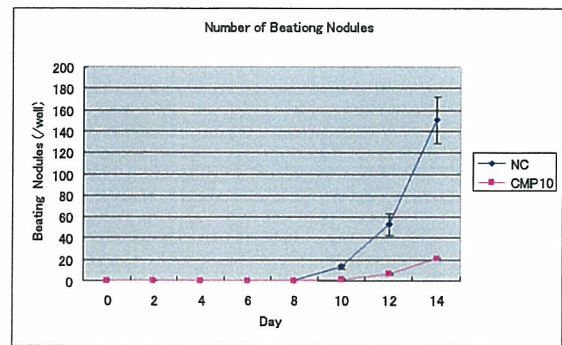
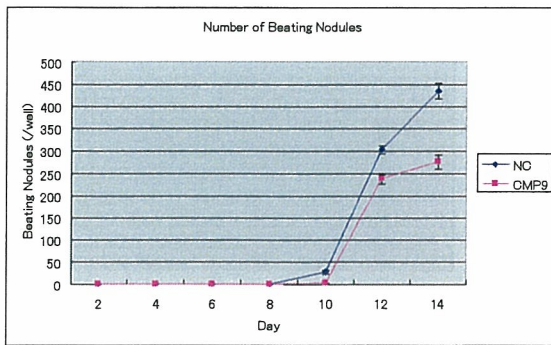


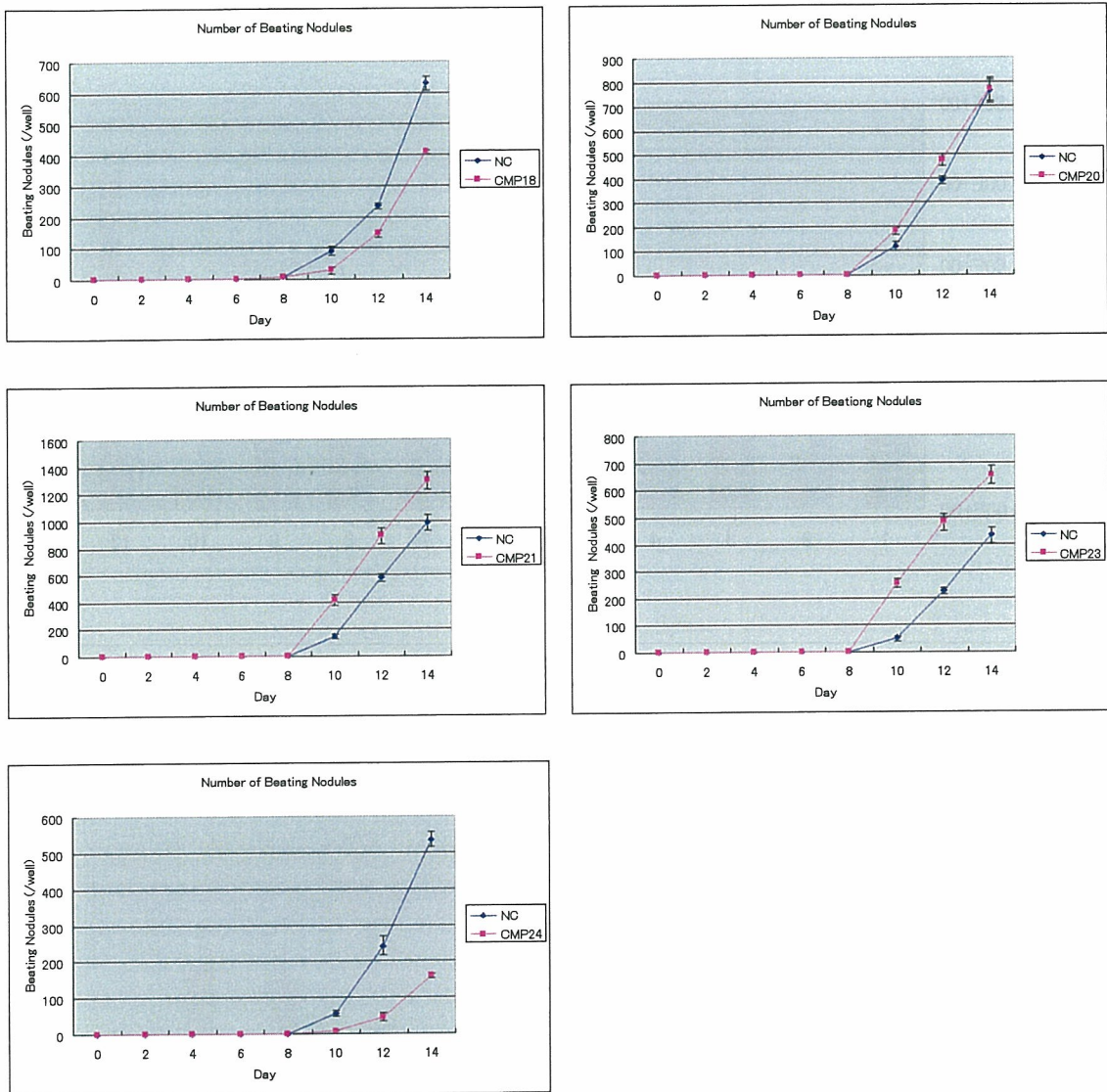
Fig.5 各 CMP 遺伝子のノックダウン効率

RNAiにより、各 CMP 遺伝子の発現がどの程度抑制されたかを示している。縦軸は CMP 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示している。11、19、22を除く19個の CMP 遺伝子で有意な発現の抑制が認められた。

[平均値±SEM (n=6)]、\*p < 0.05 vs. Negative Control







**Fig.6** 自律拍動する小結節数の時間変化

RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における自律拍動する小結節数を測定した。機能阻害により、CMP1、CMP2、CMP3、CMP4、CMP5、CMP6、CMP9、CMP10、CMP13、CMP18、CMP24 では有意な減少が、CMP7、CMP12、CMP16、CMP17、CMP21、CMP23 では有意な増加が認められた。p < 0.05 vs. Negative Control, n=4

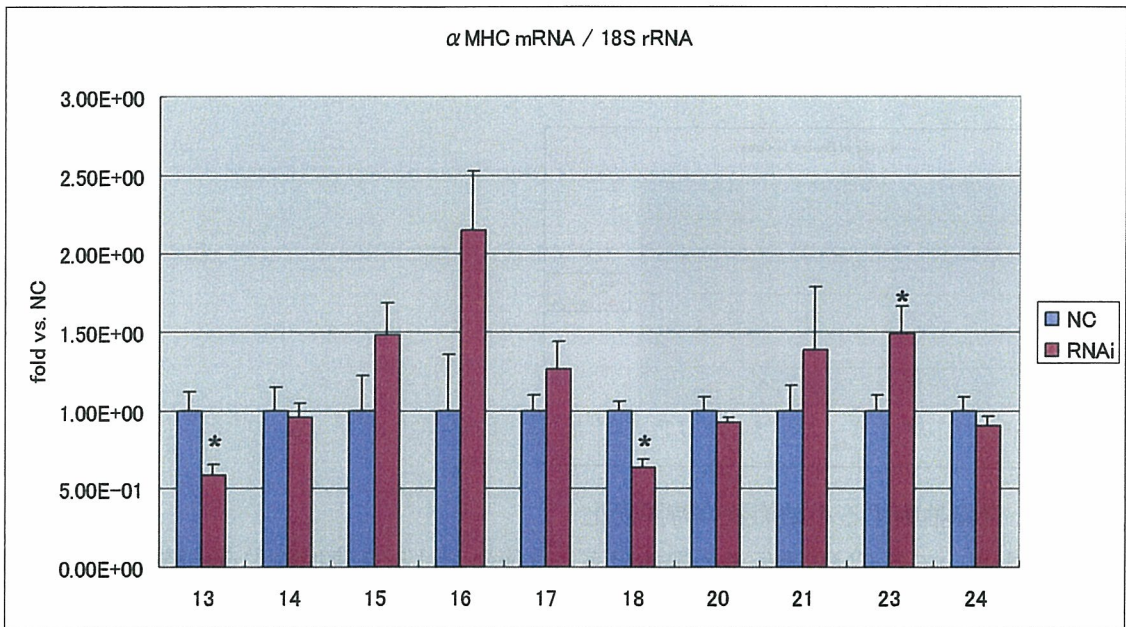
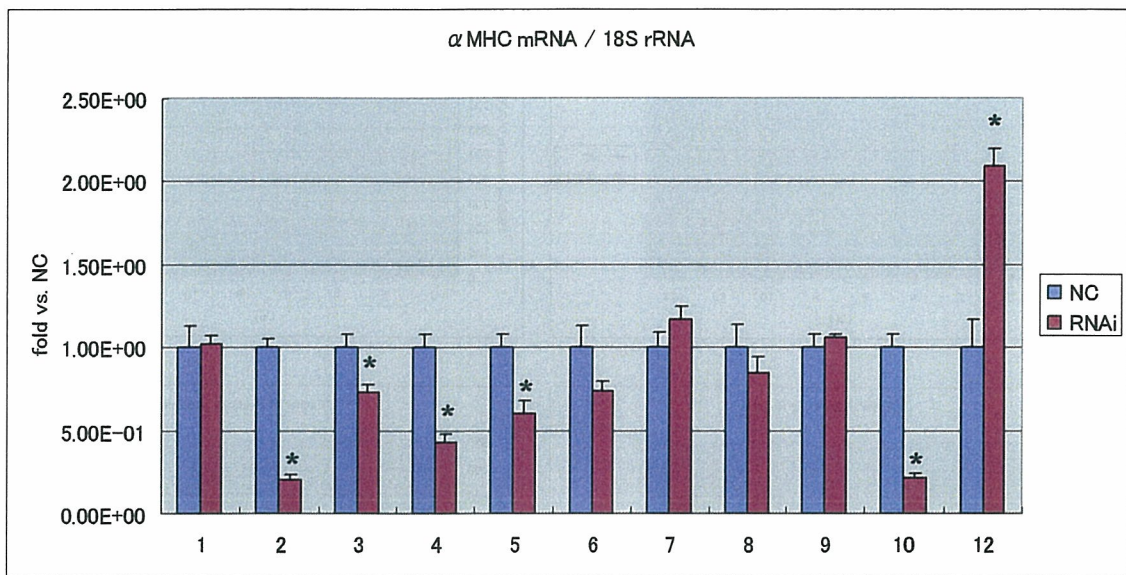


Fig.7 分化誘導後 14 日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における  $\alpha$  MHC 発現量を測定した。縦軸は、 $\alpha$  MHC 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示す。[平均値  $\pm$  SEM (n=4)]、\*p < 0.05 vs. Negative Control



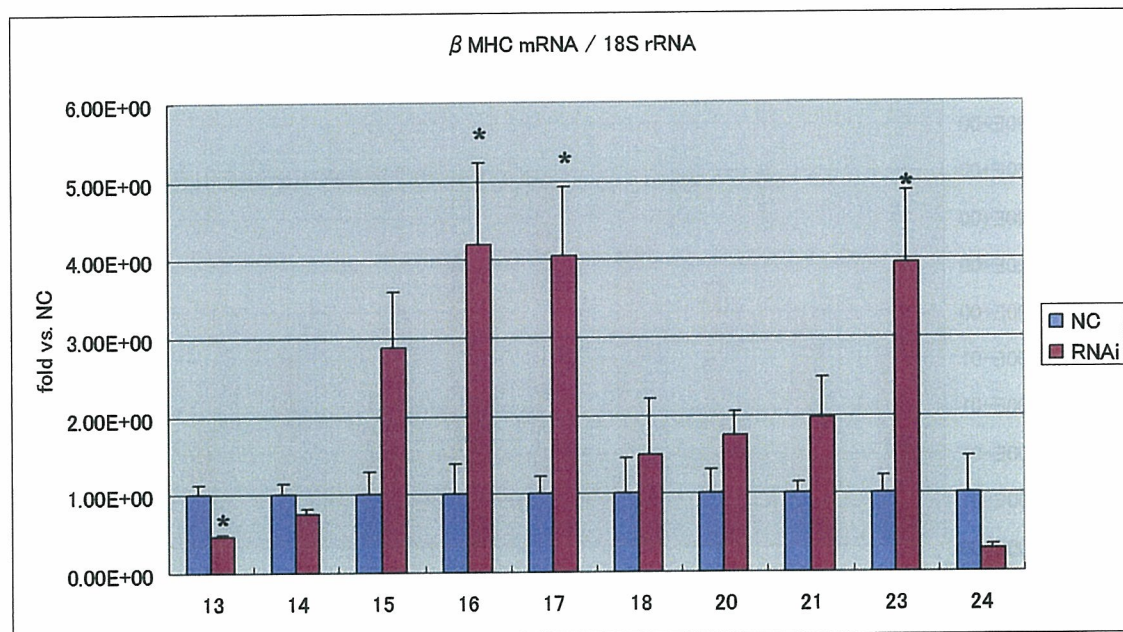
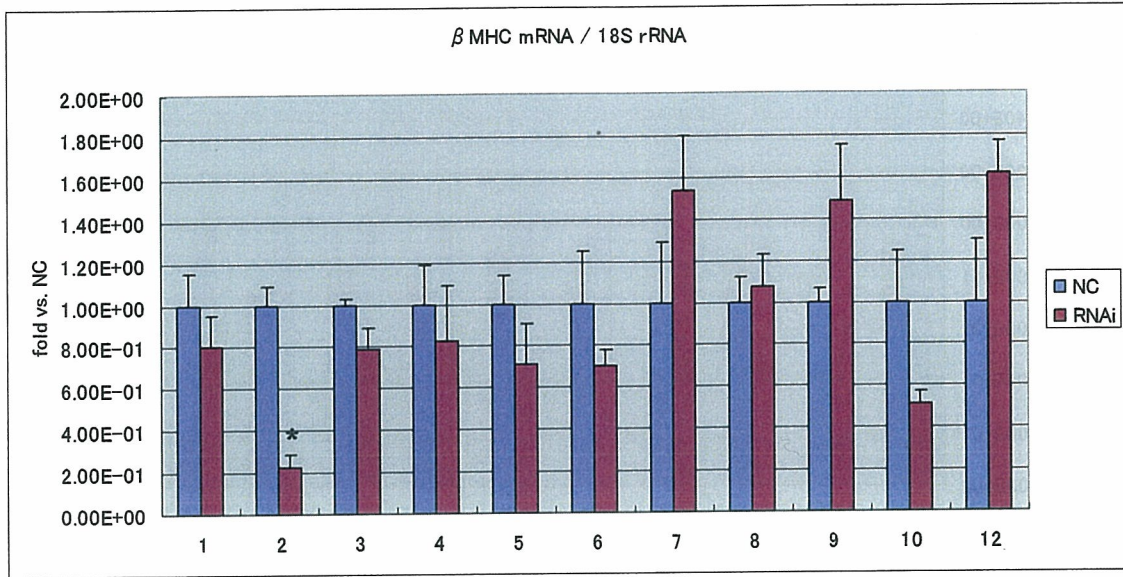


Fig.8 分化誘導後 14 日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における  $\beta$  MHC の発現量を測定した。縦軸は、 $\beta$  MHC 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示す。[平均値 $\pm$ SEM (n=4)]、\*p < 0.05 vs. Negative Control

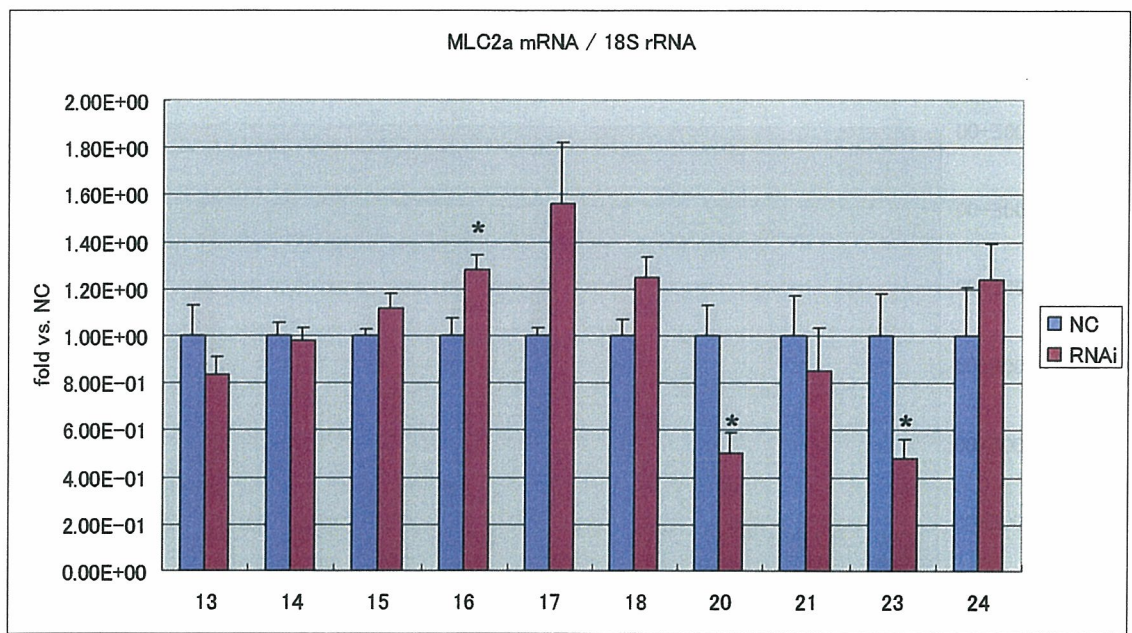
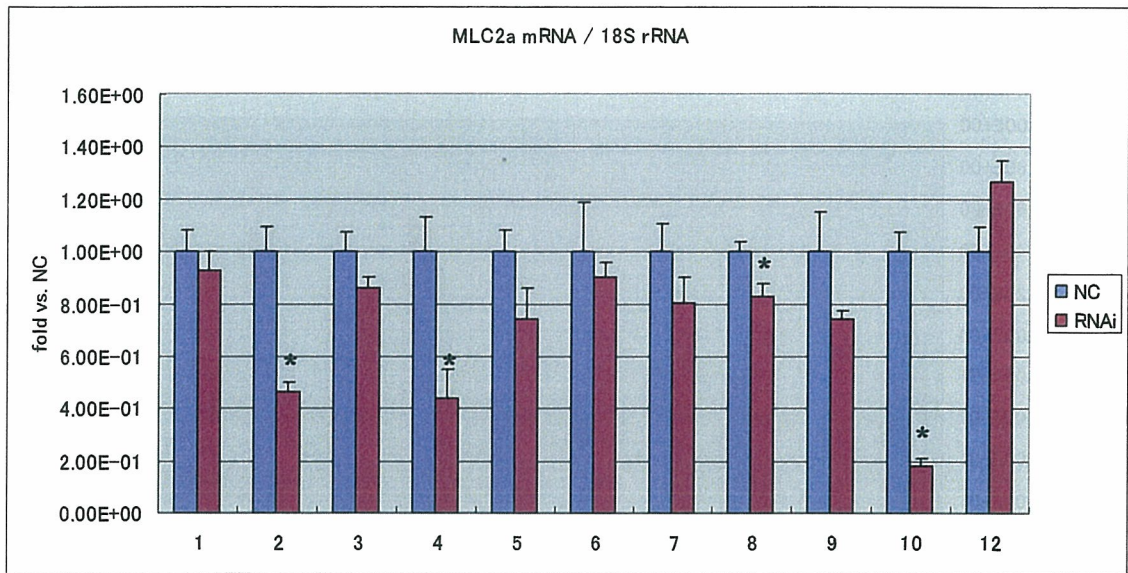


Fig.9 分化誘導後 14 日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における MLC2a の発現量を測定した。縦軸は、MLC2a 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示す。[平均値±SEM (n=4)]、\*p < 0.05 vs. Negative Control

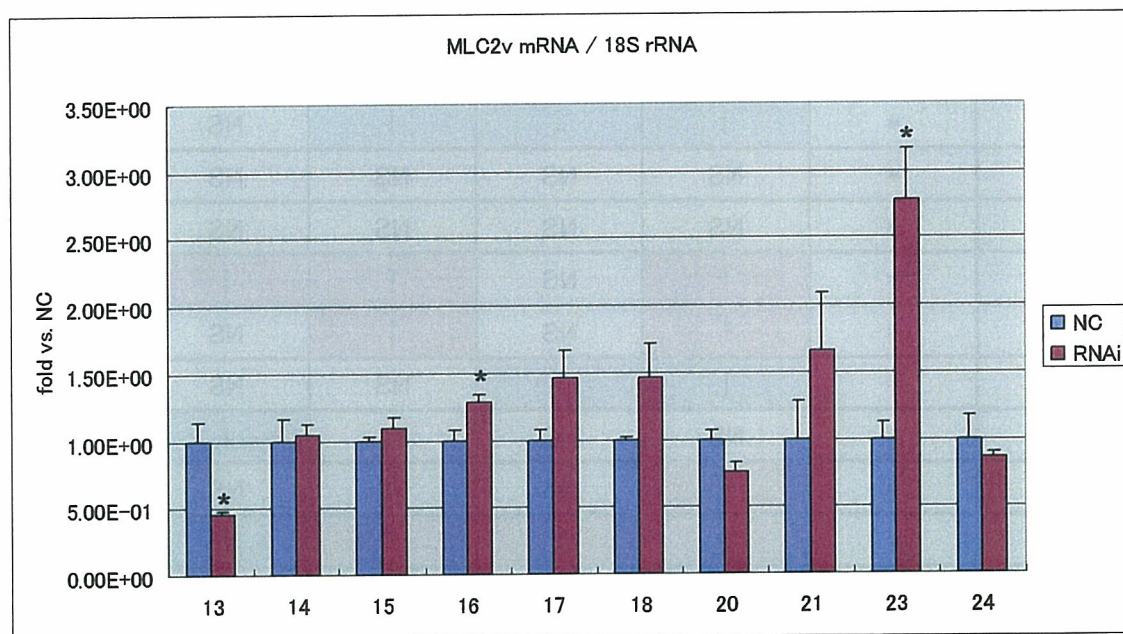
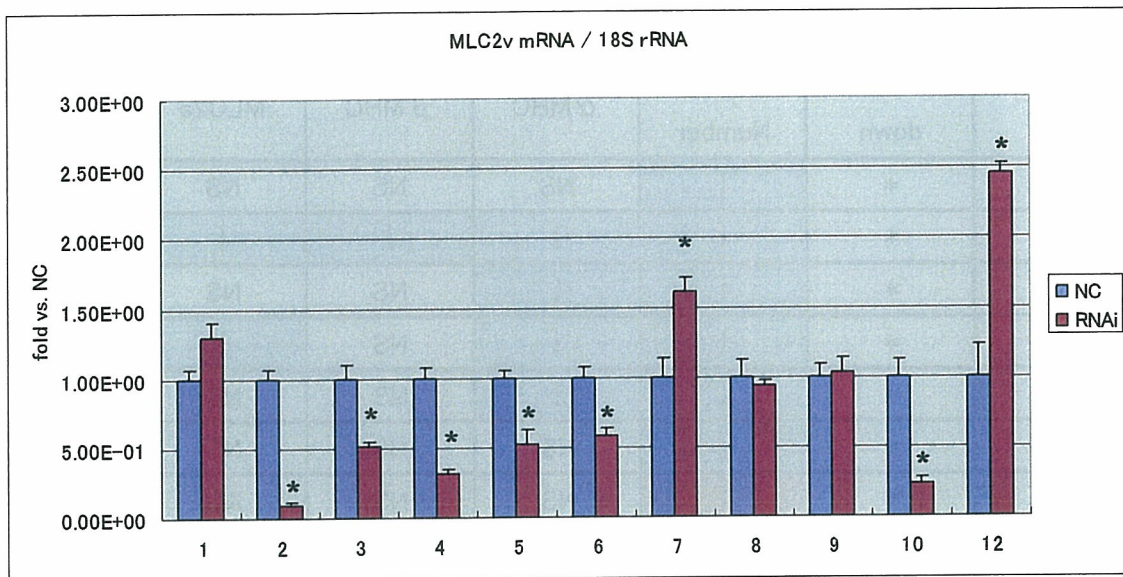


Fig.10 分化誘導後 14 日目における心筋細胞特異的マーカー遺伝子の測定

RNAi を用いて各 CMP 遺伝子の機能阻害した後における MLC2v の発現量を測定した。縦軸は、MLC2v 遺伝子の発現量のネガティブコントロールに対する比率、横軸は CMP 遺伝子の番号を示す。[平均値±SEM (n=4)]、\*p < 0.05 vs. Negative Control

Table 3 各 CMP 遺伝子の機能阻害試験

No	knock down	Nodule Number	$\alpha$ MHC	$\beta$ MHC	MLC2a	MLC2v
1	*	↓	NS	NS	NS	NS
2	*	↓	↓	↓	↓	↓
3	*	↓	↓	NS	NS	↓
4	*	↓	↓	NS	↓	↓
5	*	↓	↓	NS	NS	↓
6	*	↓	NS	NS	NS	↓
7	*	↑	NS	NS	NS	↑
8	*	NS	NS	NS	↓	NS
9	*	↓	NS	NS	NS	NS
10	*	↓	↓	NS	↓	↓
12	*	↑	↑	NS	NS	↑
13	*	↓	↓	↓	NS	↓
14	*	NS	NS	NS	NS	NS
15	*	NS	NS	NS	NS	NS
16	*	↑	NS	↑	↑	↑
17	*	↑	NS	↑	NS	NS
18	*	↓	↓	NS	NS	NS
20	*	NS	NS	NS	↓	NS
21	*	↑	NS	NS	NS	NS
23	*	↑	↑	↑	↓	↑
24	*	↓	NS	NS	NS	NS

各 CMP 遺伝子のノックダウン効率とノックダウン後の心筋細胞分化の変化を示している。\*: RNAi により有意にノックダウンされた ( $p < 0.05$  vs. Negative Control); ↓: ノックダウン後に有意に減少した ( $p < 0.05$  vs. Negative Control); ↑: ノックダウン後に有意に増加した ( $p < 0.05$  vs. Negative Control); NS: 有意差なし。

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

移植効率向上を目指したヒト造血幹細胞への高効率な遺伝子導入法の開発

分担研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所 基盤的研究部

遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー

協力研究者

川端健二 （独）医薬基盤研究所 主任研究員

櫻井文教 （独）医薬基盤研究所 研究員

村上さやか 京都薬科大学大学院

本研究は、ヒト造血幹細胞に対し骨髄 niche への接着に関与する分子などを強制発現させることによって造血幹細胞の移植効率を向上させることを目的とする。本年度は移植実験に先立ち、アデノウイルス（Ad）ベクターによるヒト造血幹細胞への遺伝子導入機構の解明を試み、以下の結果を得た。

1. Subgroup B に属する 35 型 Ad ベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入には、CD34 陽性細胞に発現した $\alpha_v\beta_3$ インテグリンと 35 型 Ad ベクターのペントンベース・RGD 配列との結合が重要であることが明らかとなった。

2.  $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとペントンベース・RGD 配列との結合は、35 型 Ad ベクターの細胞表面への吸着や細胞内取り込みよりも細胞内在化後の輸送過程に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

造血幹細胞は、その自己複製能ならびに多分化能から遺伝子治療の重要な標的細胞であるとともに、再生医療・細胞治療の細胞ソースとしても大いに期待されている。造血幹細胞を用いた治療では、造血幹細胞を一旦体外に取り出して遺伝子導入、もしくは培養・増殖させた後、患者に細胞を移植する。これまで X 連鎖重症複合免疫不全症や白血病などの難治性疾患に対し造血幹細胞を用いた治療の有効性が報告されてい

るが、一方で造血幹細胞の移植効率の低さが治療効果を妨げている原因の一つであることが明らかになってきた。そこで本研究では、造血幹細胞への遺伝子導入に優れた 35 型 Ad ベクターを用いてヒト造血幹細胞に移植効率を向上させる分子（骨髄 niche への生着を向上させるような分子など）を強制発現させることによって、移植効率の向上が可能か否かを検討することを最終目的とする。

35 型 Ad ベクターは受容体として CD46

に結合することが明らかとなっているが、CD46 結合後の遺伝子導入過程に関してはほとんど何も明らかになっていない (Fig.1)。35型Adベクターは一般に汎用されている5型 Ad ベクターと同様にペントンベースにインテグリンと親和性を有する RGD (Arg-Gly-Asn) 配列を有することから、第二受容体としてインテグリンに結合し、その結合が遺伝子導入過程に関与していることが推察される。受容体はウイルスの感染域を決定する重要因子であること、いくつかの種類のインテグリンは造血幹細胞に発現しており、nicheにおける生着に関与する接着分子であることから、35型 Ad ベクター感染へのインテグリンの関与について明らかにすることは35型 Ad ベクターによる遺伝子導入特性を理解する上で極めて重要である。そこで本年度は移植実験に先立ち、35型 Ad ベクターによる遺伝子導入におけるインテグリンの関与について検討した。

## B. 実験方法

### B-1. ペントンベース RGD 配列改変 35 型 Ad ベクタープラスミド (pAdMS19、-20) の作製

ペントンベース・RGD 配列を RGE に置換した35型Adベクタープラスミドである pAdMS19、および RGD 配列を欠損させた35型 Ad ベクタープラスミド pAdMS20 は以下のように作製した。シャトルプラスミド pHM5.4 を *AscI/EcoRI* で処理したフラグメントと、同じく *AscI/EcoRI* で処理した35型 Ad ゲノム (bp7930-21944) のフラグメントをライゲーションすることにより pHM5.4-Ad35-2 を得た。次に、*PmeI/AscI/NheI/Bst1107I/Csp45I/PacI/NotI* の

マルチクローニングサイトを有するシャトルプラスミド pFS4 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ *SphI/Csp45I* で処理したフラグメントをライゲーションし、pFS4-Ad35-1 を得た。さらに、pFS4-Ad35-1 を *Bst1107I* と *Csp45I* で切断したフラグメント (35型 Ad ゲノムの 14409 bp -15544 bp を含む) と、pFS4 を *Bst1107I* と *Csp45I* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-2 を作製した。そして、pFS4-Ad35-2 を *PvuII/PstI* 処理したフラグメントと、ペントンベース・RGD 配列付近をコードした合成オリゴ DNA (5'-CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACA TAGTTGCCAGCGACTCTACAAGGGTTG CTAACGCTGGAGAGGTCAGAGGAGAG AATTTTGCGCCAACACCTGTTCCGACTG CA-3', 5'-GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAAT TCTCTCCTCTGACCTCTCCAGCGTTAGC AACCCCTTGTAGAGTCGCTGGCAACTAT GTTTGCCTTAGCTTCTGCAGCAG-3', アンダーラインは RGE 配列に変更した部分) をライゲーションすることにより pFS4-Ad35-5 を作製した。次に、pFS4-Ad35-5 と pFS4-Ad35-1 を *SphI* と *PvuII* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-6 を得た。pFS4-Ad35-7 は、pFS4-Ad35-6 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ *I-CeuI/BlpI* 処理した後ライゲーションすることによって作製した。さらに、pFS4-Ad35-7 を *SgrAI* と *PacI* で切断したフラグメントと、pHM5.4-Ad35-2 を *SgrAI* と *PacI* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-9 を得た。そして最後

に、pFS4-Ad35-9 を *AscI/PacI* で切断したものと *Bst1107I* で消化した pAdMS18 を混和させ、大腸菌 BJ5183 株にエレクトロポレーションし、大腸菌中での相同組み換えによりプラスミド pAdMS19 を得た。pAdMS20 も pAdMS19 と同様の手順で作製した。尚、pAdMS20 作成の際に使用した合成オリゴ DNA の配列は以下の通りである。

5'-CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACAT  
AGTTGCCAGCGACTCTACAAGGGTTGC  
TAACGCTGGAGAGGTCAATTTTGCGCC  
AACACCTGTTCCGACTGCA-3'

5'-GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAAAT  
TGACCTCTCCAGCGTTAGCAACCCTTGT  
AGAGTCGCTGGCAACTATGTTTGCCTTA  
GCTTCTGCAGCAG-3'

## B-2. 35 型 Ad ベクターの作製

Green fluorescence protein (GFP) 発現 35 型 Ad ベクターは以下のように作製した。pHMCAGFP を *I-CeuI* および *PI-SceI* 処理したフラグメントと、pAdMS18 を *I-CeuI* および *PI-SceI* 処理したフラグメントをライゲーションし、pAdMS18-GFP を得た。そして、pAdMS18-GFP を Ad ゲノムの両末端に存在する制限酵素 *SbfI* で消化することにより線状にし、SuperFect Transfection Reagent (キアゲン社より入手) を用いて 60 mm 培養ディッシュに播種した 293E1B 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後約 10 日間培養し、GFP 発現 35 型 Ad ベクター Ad35GFP を得た。ペントンベース・RGD 配列を RGE (Arg-Gly-Gln) に改変した 35 型 Ad ベクター Ad35RGEGFP および RGD 配列を欠損

させた 35 型 Ad ベクター Ad35ΔRGDGFP は、ベクタープラスミド pAdMS19 および pAdMS20 を用いて Ad35GFP を同様に作製した。Fig.2 に本研究で用いた 35 型 Ad ベクターを示す。これらの 35 型 Ad ベクターの増幅および精製は常法に従った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は Maizel らの方法に従って測定した。

## B-3. ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現解析

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞は解凍後サイトカイン入り培地 (Stem Cell 社より入手、human Flt-3 ligand: 100 ng/ml, human stem cell factor; 100 ng/ml, human interleukin (IL)-3; 20 ng/ml, human IL-6; 20 ng/ml) に懸濁し 12~18 時間培養した後、実験に使用した。CD34 陽性細胞を 1% BSA-PBS (staining buffer) に懸濁し各種抗インテグリン抗体を添加後、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を staining buffer で 2 回洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識した 2 次抗体 (anti-mouse immunoglobulin specific polyclonal antibody (Pharmingen 社より入手) および anti-rat IgG (H+L) antibody (Jackson ImmunoResearch 社より入手)) を添加し、氷上で 1 時間インキュベートした後、細胞を staining buffer で 2 回洗浄した。これらの細胞をフローサイトメーターを用いて解析した。抗 $\alpha_v\beta_3$  (LM609)、抗 $\alpha_v\beta_5$  (PIF6)、抗 $\alpha_5$  (P1D6)、抗 $\beta_1$  (P4C10)、抗 $\beta_2$  インテグリン抗体 (P4H9-A11) は Chemicon International 社より、抗 $\alpha_4$  インテグリン抗体 (HP2/1) は Immunotech 社、抗 $\alpha_6$  インテグリン抗体 (GoH3) は R&D Systems 社より入手した。

#### B-4. RGD ペプチド存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、4 °C、30 分間インキュベートした。次に、RGD または RGE ペプチドを各濃度になるように添加し、4 °C、1 時間インキュベートした。その後、Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、37 °C、3 時間培養後、新鮮培地に置換し 48 時間後の GFP 発現量をフローサイトメーターを用いて検討した。

#### B-5. 35 型 Ad ベクターのヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への取り込み

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を  $3 \times 10^4$  cells/well で 48 穴プレートに播種し、Ad35GFP、Ad35RGEGFP および Ad35ΔRGDGFP を 6000 VP/cell で感染させ、37 °C、3 時間培養後に細胞を回収した。細胞を冷 PBS で 5 回洗浄した後、35 型 Ad ベクターのゲノム DNA を含む total DNA を DNeasy Tissue Kit (キアゲン社より入手) を用いて回収した。DNA 量を picogreen (Invitrogen 社より入手) で測定した後、total DNA に含まれる Ad ゲノム DNA 量を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems 社) を用いて測定した。測定条件は、25 ng サンプル DNA、0.5 μM プライマーセット、0.16 μM TaqMan probe、25 μL Real-time PCR Master Mix (TOYOBO 社より入手) を含む最終容量 50 μL の混合液を反応させ、95 °C 15 秒、60 °C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの条件で定量した。また、プライマーおよび蛍光標識プローブは 35 型 Ad ベクターの pIX 領域に設定した。配列を以下に示す。

Ad35 pIX-forward ; 5'-TGG ATG GAA GAC CCG TTC AA-3'

Ad35 pIX-reverse ; 5'-CGT CCA AAG GTG AAG AAC TTA AAG T-3'

蛍光標識プローブ ; 5'-FAM-CGC CAA TTC TTC AAC GCT GAC CTA TGC-TAMRA-3'

35 型 Ad ベクターのスタンダードとしては 35 型 Ad ベクターのプラスミド pAdMS4 を用いた。

#### B-6. 抗インテグリン抗体存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、4 °C、30 分間インキュベートした。次に、抗インテグリン抗体を 50 μg/mL で添加し、4 °C、1 時間インキュベートした。その後 Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、37 °C、3 時間培養した。新鮮培地に交換の後再度培養し、遺伝子導入 48 時間後にフローサイトメーターを用いて GFP 発現量を測定した。

### C. 研究結果

まず初めに、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、 $\alpha_4$ 、 $\alpha_5$  および  $\beta_2$  インテグリンがほぼ 100% の細胞で発現していた (Fig.3)。また、発現レベルはやや低いものの 13% の細胞で  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンが、2% の細胞で  $\alpha_v\beta_5$  インテグリンが発現していた。尚、CD34 陽性細胞におけるインテグリンの発現について 2 人のドナー由来の細胞を解析したが、どちらの細胞においても同程度の発現が得ら



れた (data not shown)。

次に、35 型 Ad ペントンベース・RGD 配列の感染への関与について検討するために、RGD ペプチドによる 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、インテグリンに結合しない RGE ペプチド作用群と比較して、RGD ペプチド存在下では濃度依存的に有意な遺伝子導入阻害が見られた (Fig.4)。RGD ペプチド 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  存在下で 43%まで遺伝子導入効率が低下した。以上の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にはペントンベース・RGD 配列が関与していることが示唆された。また本結果より、インテグリンの中でも RGD 配列を認識するインテグリンが関与していることが示唆された。

さらにペントンベースの RGD 配列の関与について検討するため、35 型 Ad ベクターのペントンベースに存在する RGD 配列を RGE に置換 (Ad35RGEGFP)、または欠損 (Ad35 $\Delta$ RGDGFP) させた 35 型 Ad ベクターを作製し、通常の 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率と比較した。その結果、通常の 35 型 Ad ベクターと比較して、Ad35RGEGFP および Ad35 $\Delta$ RGDGFP のいずれのベクターを作用させた場合においても遺伝子導入効率の有意な低下が観察され、それぞれ Ad35GFP の 20%または 17% まで遺伝子発現量が低下した (Fig.5)。従って、前節の RGD ペプチドを用いた 35 型 Ad ベクター遺伝子導入阻害実験および本実験の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にペントンベース・RGD 配列とインテグリンの結合が関与していることが明らかとなった。

次に、ペントンベース・RGD 配列改変

35 型 Ad ベクターの細胞内取り込み量を Real-time PCR を用いて測定した。RGD 配列改変 35 型 Ad ベクターの細胞内ベクターコピー数は従来の 35 型 Ad ベクターと比較して、Ad35RGEGFP および Ad35 $\Delta$ RGDGFP とともに有意な差は認められなかった (Fig.6)。さらに CD34 陽性細胞の細胞表面への結合量に関しても差は見られなかった (Fig.7)。以上の結果から、ペントンベース・RGD 配列改変による遺伝子発現量の低下は、35 型 Ad ベクターの細胞表面接着や細胞内取り込み過程ではなく、それ以降の細胞内輸送が妨げられたことに起因していることが示唆された。

さらに 35 型 Ad ベクターによる CD34 陽性細胞への遺伝子導入に関与しているインテグリン分子を同定するために、種々の抗インテグリン阻害抗体を用いて 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、抗 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン抗体存在下でコントロール IgG 作用群と比較して 59%まで遺伝子導入効率が低下した (Fig.8)。しかし、その他の抗体を作用させた場合には有意な差は認められなかった。従って、35 型 Ad ベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入に $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが関与していることが示された。

#### D. 考察

35 型 Ad ベクターの遺伝子導入機構を明らかにすることは、35 型 Ad の特性の解明に繋がるだけではなく、より高性能なベクター開発に向けて必要不可欠である。一般に使用されている 5 型 Ad ベクターの感染機構については多くの報告があり、第一受容

体である coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR)にファイバーノブが結合した後、ペントンベースの RGD 配列が $\alpha_v$  インテグリンに結合することにより内在化を受け、感染にいたることが知られている。一方で、① subgroup B に属する 35 型 Ad のペントンベースにも RGD 配列が存在する、②造血幹細胞において幾つかのインテグリンが発現している、③subgroup B Ad の受容体である CD46 が細胞膜上で一部のインテグリンと会合していることから、35 型 Ad によるヒト造血幹細胞への遺伝子導入においてもペントンベース・RGD 配列とインテグリンとの結合が関与することが推察された。そこで本研究では、35 型 Ad ベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入におけるインテグリンの関与について検討を行い、35 型 Ad ベクターの遺伝子導入に $\alpha_v\beta_3$  インテグリンが関与していることを明らかにした。

本研究において、ペントンベース・RGD 配列の改変により 35 型 Ad ベクターの細胞表面接着量および細胞内取り込み量は変化しなかった。Segerman や Tuve らは EDTA を用いてインテグリンとの結合に必須である金属イオンをキレートした場合においても、35 型 Ad の細胞への接着に影響を及ぼさないことを報告している。従って、35 型 Ad ベクターの細胞表面への接着および細胞内への取り込みには CD46 との結合が重要であり、インテグリンとペントンベース・RGD 配列との結合は関与しないものと考えられる。しかしながら RGD ペプチドにより遺伝子導入阻害が見られたこと、RGD 配列改変により遺伝子導入効率が大きく減弱したことから、細胞内在化以降の過程に

RGD 配列とインテグリンとの結合が大きく関与していることが示唆された。5 型 Ad ベクターの場合、ペントンベースと $\alpha_v\beta_5$  インテグリンの結合がベクター粒子のエンドソームからの脱出を促進することが報告されていることから、35 型 Ad ベクターにおいても細胞内に取り込まれた後にエンドソーム膜を破壊し細胞質へ脱出する過程に $\alpha_v\beta_3$  インテグリンとの結合が関与しているのではないかと考えられる。これまでに $\alpha_v\beta_3$  インテグリンを受容体とするウイルスとしては、他にもヘルペスウイルス、ウエストナイルウイルスが報告されているが、これらのウイルスは $\alpha_v\beta_3$  インテグリンを細胞表面への接着および細胞内への侵入に利用しており、その点で 35 型 Ad はこれらのウイルスと大きく異なっている。しかし 35 型 Ad にとって $\alpha_v\beta_3$  インテグリンはあくまでも第二受容体であり、その感染には CD46 が必須であると思われる。我々は 35 型 Ad ベクターを $\alpha_v\beta_3$  インテグリンは発現しているが、CD46 を発現していないマウス黒色腫細胞 B16 に作用させたが、ほとんど遺伝子発現は得られなかった (data not shown)。

Shayakhmetov らは 5 型 Ad ベクターと 5 型 Ad ベクターのノブを 35 型 Ad のノブに置換し、さらにペントンベース・RGD 配列を欠損させた Ad ベクターを作製し、遺伝子導入効率を検討している。その結果、5 型 Ad ベクターではペントンベース RGD 配列の欠損により遺伝子導入効率に変化は認められなかったが、35 型ファイバーノブを有する 5 型 Ad ベクターは RGD 配列の欠損により有意に遺伝子導入効率が低下したと報告している。今回の検討においても、35 型 Ad ベクターのペントンベース・RGD 配列

を欠損させることにより、ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞においては 83%阻害がかかっていることから、35 型 Ad ベクターの遺伝子導入におけるペントンベース RGD 配列とインテグリンとの結合の寄与は 5 型 Ad ベクターより大きいと言える。つまり、第一受容体として何を認識するかによってインテグリンの寄与の程度が異なっているものと思われる。

結合する受容体により細胞内輸送機構も異なってくると考えられる。5 型 Ad ベクターの場合、CAR と結合した後、RGD 配列とインテグリンとの結合により phosphatidylinositol-3-kinase が活性化され、アクチンの重合が促進されることによりクラスリン被覆小胞が形成され、細胞内に取り込まれる。35 型 Ad ベクター取り込みにおいてクラスリン被膜小胞が形成されるかどうかは不明であるが、Crismeen-Irwin らは、CD46 を受容体とする麻疹ウイルスが CD46 との結合を介してマクロピノサイトーシスにより取り込まれることを報告している。35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベクターの細胞内取り込みとは異なり、マクロピノサイトーシスにより取り込まれているためにペントンベース・RGD 配列を欠損させても細胞内取り込み量に差が見られなかったのかも知れない。

RGD ペプチドと RGD 配列を認識するインテグリンとの親和性は RGD に続く 4 番目のアミノ酸に影響を受けること、35 型 Ad ベクターのペントンベースに含まれる RGDN (N=Asn) 配列は  $\alpha_5\beta_1$  インテグリンとの親和力が強いという報告がある。ヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞では  $\alpha_5\beta_1$  インテグリンが高発現していたことから、当初 35 型

Ad ベクターの遺伝子導入に関与するインテグリンは  $\alpha_5\beta_1$  ではないかと推察していた。 $\alpha_5\beta_1$  インテグリンは 5 型 Ad の細胞表面への結合にも関与することが報告されている。しかし、 $\alpha_5$  および  $\beta_1$  インテグリン、いずれの阻害抗体を用いても 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害は認められなかった。なぜ  $\alpha_5\beta_1$  インテグリンが 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入に関与していないのかについては不明である。もしかすると、35 型 Ad はエンドソームからの脱出などの細胞内輸送にのみインテグリンを利用しており、 $\alpha_5\beta_1$  インテグリンは細胞内輸送には関与しないのかもしれない。今回得られた成果はインテグリン配列を利用した、造血幹細胞に高効率に導入可能なベクターの開発において重要な知見である。

## E. 結論

35 型 Ad ベクターによるヒト骨髄由来 CD34 陽性細胞への遺伝子導入において、 $\alpha_5\beta_3$  インテグリンとペントンベース・RGD 配列との結合が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在、骨髄 niche への接着に関与する分子を発現する 35 型 Ad ベクターの作成に取り組んでおり、今後その機能について検討する予定である。

## F. 健康危険情報

該当項目なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sakurai F., Murakami S., Kawabata K., Okada N., Yamamoto A., Seya T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Crucial role

- of the short consensus repeats 1 and 2 of human CD46 on infection of subgroup B adenovirus serotype 35. *J. Control. Release.*, 113, 271-278 (2006)
2. Sakurai F., Kawabata K., Koizumi N., Inoue N., Okabe M., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice. *Gene Ther.*, 13, 1118-1126 (2006)
  3. Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. Characterization of adenovirus serotype 35 vectors using genetically modified animals and nonhuman primates. *Yakugaku Zasshi.* 126, 1013-1019 (2006)
  4. 櫻井文教・水口裕之；新しいアデノウイルスベクターの開発、バイオサイエンスとインダストリー、64(5)、11-16 (2006)
  5. 水口裕之；アデノウイルスベクター開発の最前線、バイオテクノロジージャーナル、印刷中
  6. 川端健二・櫻井文教・水口裕之；改良型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子デリバリー、**Drug Delivery System**、印刷中
2. 学会発表
1. 村上さや香、櫻井文教、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、水口裕之；35型アデノウイルスベクター遺伝子導入機構の解明ーインテグリンの関与に関する検討ー；第2回創剤フォーラム若手発表討論会（京都）；2006年10月13-14日
  2. Sakurai F, Akitomo K, Kawabata K, Mizuguchi H. Downregulation of CD46 by adenovirus serotype 35 vectors; 第12回日本遺伝子治療学会（東京）；2006年8月24-26日
  3. Sakurai F, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus Serotype 35 Vector-mediated Gene Transfer into Human and Mouse Hematopoietic Progenitors; The first FIP-APSTJ joint workshop on gene delivery (Sapporo)；2006年7月10-12日
  4. 村上さや香、櫻井文教、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、早川堯夫、水口裕之；35型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入における $\beta 1$ インテグリンの関与に関する検討；第21回日本DDS学会（東京）；2006年7月7-8日
  5. Sakurai F, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction in mouse hematopoietic stem cells isolated from human CD46-transgenic mice; 9<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene Therapy；2006年6月 (Baltimore, USA)